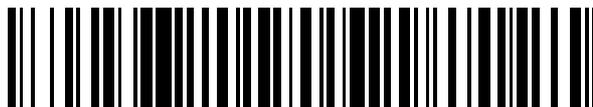


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 256**

21 Número de solicitud: 201330933

51 Int. Cl.:

C12Q 1/18 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.01.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070511

71 Solicitantes:

**BIOMEDAL S.L. (50.0%)
AVDA AMERICO VESPUCIO Nº 5-4 PLANTA 1
MOD 12
41092 SEVILLA ES y
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MUÑOZ SUANO, Alba;
CEBOLLA RAMIREZ, Angel;
CISNEROS HERREROS, José Miguel;
PACHÓN DÍAZ, Jerónimo;
MCCONELL, Mike;
LEPE, Jose Antonio;
DOCOBO, Fernando;
PACHÓN IBÁÑEZ, M^a Eugenia y
GARBACHO MONTERO, José**

54 Título: **DETERMINACIÓN RÁPIDA DE SUSCEPTIBILIDAD A COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a métodos e instrumentos para la determinación de susceptibilidad a distintos compuestos por parte de diferentes microorganismos. Más específicamente, se refiere a la determinación de susceptibilidad a antibióticos por parte de microorganismos patógenos multirresistentes. La presente invención hace referencia a la utilización de un componente iónicamente entrecruzable utilizado para la producción de microesferas mediante técnicas de microencapsulación. La presente invención se refiere también a una metodología para el análisis de la proliferación microbiana dentro de esas cápsulas y a la interpretación de los mismos.

ES 2 527 256 A1

DESCRIPCIÓN

DETERMINACIÓN RÁPIDA DE SUSCEPTIBILIDAD A COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS

Estado del arte

- 5 La presente invención se refiere a métodos e instrumentos para la determinación de susceptibilidad a distintos compuestos por parte de diferentes microorganismos. Más específicamente, se refiere a la determinación de susceptibilidad a antibióticos por parte de microorganismos patógenos multirresistentes. La presente invención hace referencia a la utilización de un componente iónicamente entrecruzable utilizado para la producción de
- 10 microesferas, dichas microesferas serán producidas mediante la aplicación de técnicas de microencapsulación, más específicamente de una tecnología de encapsulación mediante flowfocusing, que garantiza una producción monodispersa de microesferas. La presente invención hace referencia también a una metodología para el análisis de la proliferación microbiana dentro de esas cápsulas y a la interpretación de los mismos.
- 15 La determinación de susceptibilidad a antibióticos es un procedimiento con una importancia crucial en los laboratorios microbiológicos clínicos para la definición del tratamiento óptimo frente a una determinada infección microbiana. Los tratamientos empíricos se siguen llevando a cabo en aquellas infecciones causadas por microorganismos que todavía no han desarrollado mecanismos de resistencias a antibióticos, sin embargo, la proliferación de microorganismos
- 20 que han incorporado diversos mecanismos de resistencia ha aumentado exponencialmente, incrementando así el riesgo de implementar terapias antibióticas incorrectas por determinaciones deficitarias de la resistencia.

Existen numerosas técnicas para la determinación de la susceptibilidad a antibióticos, las técnicas clásicas descritas en los 1970s, revisadas por Jorgensen y Ferraro en Antimicrobial

25 Susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices; Medical Microbiology CID 2009: 49.

Entre estas técnicas clásicas cabe destacar las diluciones seriadas en medio de crecimiento microbiano con crecientes concentraciones de antibiótico y la técnica de difusión de disco de

Bauer-Kirby (1966) (Woods gl, Washington JA. Antimicrobialsusceptibilitytests: dilution and disk diffusionmethods).

En las técnicas clásicas se necesitan 72h desde el procesamiento de la muestra hasta la obtención de los resultados de los ensayos de susceptibilidad. 24 horas para el crecimiento en
5 placa, 24 horas para el aislamiento de clones y 24 h para la determinación de la susceptibilidad a antibióticos.

La reducción del tiempo hasta la consecución de resultados objetivos, sin afectar la precisión y la reproducibilidad, para la implementación de la terapia correcta es de crucial importancia en los laboratorios clínicos microbiológicos.

10 El desarrollo de técnicas para la reducción de este tiempo de procesamiento ha centrado el esfuerzo de numerosas empresas de biotecnología y grupos de investigación.

Entre los avances descritos en el estado del arte, se encuentran los sistemas automatizados, con ellos se consigue reducir a 3,5h para determinaciones de gram negativas en el MicroScanWalkAway (Siemens HealthCareDiagnostics) a 18h en el Sensititre AIRIS 2x
15 (TrekDiagnosticsSystemes). Estos sistemas, basados en el análisis de la proliferación microbiana basándose en técnicas fluorimétricas, además de reducir el tiempo incrementan la objetividad debido a la mecanización de los procesos y a la disminución de los errores en la realización de los procedimientos. Sin embargo, hay microorganismos más complejos que requieren de incubaciones más largas por lo que la reducción del tiempo no es igual en todos
20 los casos. Los inconvenientes de estos sistemas son generalmente el alto precio tanto de implementación como de mantenimiento, así como el hecho de que son sistemas cerrados, con un determinado formato predefinido y una serie de microorganismos para los que son válidos que no siempre coinciden con los requerimientos de un determinado entorno clínico.

La encapsulación celular y su aplicación en clínica está descrita en la bibliografía desde 1960s
25 (CHANG TMS (1964) Semipermeable microcapsules. Science 146(3643):524-525., Chang T.M.S. Artificial Cells, Springfield, III. Charles C Thomas (1972)).

En el campo que nos ocupa de la determinación de susceptibilidad a antibióticos, se han ido aplicando técnicas de encapsulación para el análisis individualizado de microorganismos. El concepto más extendido es el de ensayo de crecimiento por microgotas en gel o GMD (gel
30 microdrop) (patente EP0411038A1), en el, se encapsulan los microorganismos en gotas de

agarosa y se analiza el crecimiento de los microorganismos dentro de los mismos en determinados condiciones (Journal of Microbiological methods 62 (2005)181-197).

Esta tecnología presenta algunas desventajas, en primer lugar las encapsulaciones se realizan con agarosa, esta agarosa necesita una temperatura elevada para poder utilizarla, sometiendo a los microorganismos a temperaturas superiores a los 40°C. Además el procedimiento para la realización de los microgotas es por emulsión con un aceite, esto hace que se necesiten numerosos pasos posteriores para la eliminación del aceite con el consiguiente sufrimiento celular y la imposibilidad de uso del sistema para microorganismos más sensibles a la temperatura o al estrés. Sin embargo el sistema es muy bueno porque permite el análisis individualizado del crecimiento bacteriano, reduciendo el número de divisiones necesarias para hacer patente un efecto del compuesto analizado sobre el crecimiento celular. Un problema añadido al sistema es la variabilidad en el tamaño de las capsulas producidas, mediante las emulsiones es muy difícil controlar el tamaño de la capsula y por tanto la cantidad de bacterias en ellas. La obtención de resultados a partir de estas técnicas se realiza a través de citometría de flujo, esta técnica aunque muy precisa y consistente, tiene el problema del tamaño máximo que puede analizar, teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente sobre el poco control que hay sobre el tamaño de capsulas cuando se produce por emulsión, requiere un paso previo al análisis de filtrado, esto puede inducir un error en el análisis al descartar una población de capsulas por su tamaño. Además la citometría de flujo requiere de una capacitación del personal que lo maneja, y esto dificulta su introducción en el ámbito clínico que estamos tratando.

En esta misma línea de desarrollo, se han publicado distintas técnicas para la determinación de susceptibilidad a antibióticos basados en análisis individualizados de crecimiento celular. En el caso del artículo publicado en Labon Chip en 2013 (Lab Chip, 2013,13,280), utilizan un sistema de microfluídica para fijar las bacterias en unos canales de agarosa, mediante difusión, se ponen en contacto con un gradiente de concentración del antibiótico analizado y mediante un análisis por microscopia, se determina que concentración inhibe el crecimiento del microorganismo en cuestión. Este sistema, reduce mucho el tiempo hasta la obtención de resultados a 3h, sin embargo, la lectura de los resultados necesita de un tratamiento de imágenes complejo que permita diferenciar si esas células están en crecimiento o no. Además de los inconvenientes debidos a la utilización de agarosa (temperatura) y de microfluídica (manejo).

Una combinación de las dos técnicas anteriores es la aplicación de microfluídica para la encapsulación de microorganismos y su análisis de susceptibilidad a diversos compuestos (ACS ChemicalBiology 2011,6, 260-266) mediante la aplicación de microfluídica para la producción de capsulas monodispersas mediante flow-focusing, conteniendo 1-0 bacterias y el análisis del crecimiento de las mismas dentro de las capsulas por citometría de flujo, en este caso, siguen utilizando agarosa, con el consiguiente requerimiento térmico necesario para su manejo. Además utilizan el citómetro para la obtención de resultados cuyos inconvenientes han sido discutidos con anterioridad.

Enfocamiento de chorro® es una tecnología de manipulación de microfluidos para la generación de gotas monodispersas, basada en la producción de microchorros capilares que son “enfocados” hacia un orificio (US6,464,886). Descubierta en 1994 por el grupo de investigación del profesor Alfonso Gañán-Calvo. Esta tecnología permite diseñar y producir micropartículas con tamaño, estructura y composición seleccionables. Esta tecnología se ha desarrollado hasta un instrumento (Cellena ®) que permite la encapsulación mediante FlowFocusing® de células manteniendo su viabilidad mediante la utilización de polímero de gelificación iónica como el alginato, ampliamente reportado como biocompatible en otros campos de investigación y desarrollo como la terapia celular (US4352883). Esta técnica de encapsulación, proporciona un control muy elevado del tamaño de partículas a producir, se lleva a cabo a temperatura ambiente, en solución acuosa sin aceites y además sin someter a las células a fuerzas vibracionales o electroestáticas para su producción.

La aplicación de esta tecnología al estudio de microorganismos ha sido documentada para la detección de mutantes en levadura (NAR Sebastian Chavez) acoplada al análisis del crecimiento dentro de las microesferas a un citómetro de flujo específico para partículas grandes. Sin embargo, esta instrumentación es costosa y compleja de manejar por técnicos de laboratorio de los sistemas de salud. Lo que dificulta su implementación para el análisis rutinario de susceptibilidad a antibióticos.

Compendio de la invención

En la presente invención se describen los métodos y procedimientos para la encapsulación de células, específicamente células microbianas con el objetivo de realizar análisis de susceptibilidad a diversos compuestos mediante la directa observación de la proliferación celular de las células encapsuladas.

Más específicamente, la invención comprende un sistema patentado de encapsulación mediante tecnología de enfocamiento de chorro, una metodología de incubación frente a distintos compuestos objetos de análisis, y un procedimiento de análisis.

El procedimiento de encapsulación está basado en la utilización de polímeros entrecruzables iónicamente, más específicamente el alginato, mezclado con células microbianas objetos del estudio. Este procedimiento de encapsulación se realiza aplicando la tecnología de enfocamiento de chorro. Las células encapsuladas pasarían entonces a estar en contacto con los compuestos sujetos al análisis, más específicamente, esos compuestos pueden ser antibióticos. Tras un periodo de incubación corto, se realiza el análisis de las microcolonias que han crecido dentro de las microesferas. Este análisis se hace de forma específica mediante el análisis por microscopía de la formación de microcolonias dentro de las microesferas. La diferencia en el diámetro de la microcolonia formada dentro de la microesferas nos da una idea del efecto que dicho compuesto testado tiene frente al organismo en cuestión microencapsulado.

Mediante la aplicación de esta secuencia de procedimientos, el tiempo necesario para obtener resultados se ve reducido de 24 a 8h aproximadamente, dependiendo del tipo de microorganismo. Es un sistema abierto en el que tanto los compuestos como los microorganismos analizados se pueden seleccionar según la epidemiología específica del laboratorio microbiológico.

En otro aspecto más de la invención, este procedimiento puede ser aplicado a muestras clínicas, de forma específica a muestras clínicas líquidas o mucosas, como por ejemplo aspirados broncoalveolares, de forma directa, sin necesidad de aislamiento previo de los microorganismos causantes de la infección, mediante la aplicación de una modificación en el protocolo de encapsulación, pero siguiendo los mismos pasos básicos que componen esta invención.

Otro aspecto más de esta invención es la identificación de clones heterorresistentes y la posterior selección del mismo.

Otro aspecto más de esta invención es el aislamiento de clones con características fenotípicas diferenciables.

Breve descripción de los dibujos

La Fig.1 es un ejemplo de cápsulas monodispersas producidas mediante la tecnología Flow-Focusing, empleada en esta invención.

La Fig.2 es un ejemplo del crecimiento microbiano a lo largo del tiempo y la formación de microcolonias.

La Fig.3 es un gráfico del análisis estadístico poblacional del tamaño de las microcolonias dependiendo del efecto del compuesto añadido sobre el microorganismo encapsulado.

La Fig.4 es un gráfico que representa el tamaño medio de las microcolonias según el efecto que el compuesto analizado tenga sobre el microorganismo encapsulado.

10

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Célula, en este documento hace referencia a la unidad estructural más pequeña de un organismo que es capaz de funcionar independientemente o un organismo unicelular, que está compuesta de uno o más núcleos, citoplasma y varios orgánulos, rodeada por una membrana celular semipermeable o una pared celular. La célula puede ser eucariota, procariota, animal, planta o archeobacteria. En el contexto de esta invención las células serán mayoritariamente procariotas.

Muestra clínica es el origen de los microorganismos a encapsular, puede ser de naturaleza líquida o mucosa o semisólida y podría ser utilizada o bien para aislar los microorganismos de interés para su posterior análisis o bien para ser tratada directamente para su análisis.

Microencapsulación, es el proceso de recubrimiento de moléculas, partículas sólidas, o glóbulos líquidos con materiales de distinta naturaleza para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. En el contexto de esta invención, microencapsulación es el proceso de recubrimiento de células para la formación de microesferas.

Enfocamiento de chorro, a partir de ahora referida en el documento como FF (FlowFocusing, siglas en inglés), es la tecnología preferente para la encapsulación en el contexto de esta invención. La selección de esta tecnología se basa fundamentalmente en que tiene pocos

efectos sobre la viabilidad celular al ser muy suave en el uso de presiones, ejerciendo menos influencia sobre las condiciones vitales de la célula encapsulada y aportando objetividad a la encapsulación.

5 Microesferas, son partículas de tamaño homogéneo y semipermeables que contienen en su interior una o más de una célula.

Microcolonia, es el resultado de la proliferación de una célula en el interior de una microesferas, generalmente adopta una conformación esférica y opaca en el contexto translúcido de la microesfera, lo que la hace fácilmente distinguible.

10 En el contexto de esta invención, la muestra puede ser tratada de forma directa para su posterior encapsulación y análisis, reduciendo el tiempo de determinación de susceptibilidad de 48-72h a 20-24h obteniendo de forma simultánea aislados y datos de susceptibilidad.

15 La muestra clínica puede ser, de forma preferente para esta invención, líquida o mucosa, por ejemplo un aspirado broncoalveolar. Para su procesamiento se diluye entre 5 y 10 μL de la muestra en 500 μL de suero fisiológico, esta dilución se deja agitando en vortex durante 20-30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se procede a la mezcla de estos 500 μL con el material de encapsulación, siguiendo el procedimiento descrito a continuación.

20 El método seleccionado para la encapsulación de células en el contexto de esta invención es la tecnología FF (US6,464,886). El material preferido para este procedimiento de encapsulación son los polímeros entrecruzables iónicamente.

25 Entre los materiales utilizados para esta invención se incluyen, pero no están limitados a, alginato y polisacáridos naturales tales como quitopectina, goma gelan, goma de xantano, ácido hialurónico, heparina, pectina y carragenano. Entre los ejemplos de polianiones iónicamente entrecruzables para su uso en la práctica de la presente invención se incluyen pero no están limitados a, ácido poliacrílico y ácido polimetacrílico. Los policationes iónicamente entrecruzables tales como la polietilenimina y polilisina también son adecuados para la presente invención.

En una realización preferida de la presente invención se utilizará alginato (alginato referido aquí corresponde con sales de ácido algínico) como polímero entrecruzable iónicamente, a un

intervalo de concentración entre el 0,5% y 5% p/v. Preferiblemente el alginato se proporciona en un intervalo de concentración entre el 1,5% y 2% p/v. En el caso de encapsular muestras clínicas de forma directa, el porcentaje preferido de esta invención es 2% p/v.

5 El procedimiento de entrecruzamiento del polímero iónicamente entrecruzable se lleva a cabo mediante la adición de la mezcla de encapsulación de cationes multivalente, tales como calcio, cinc, bario, estroncio, aluminio, hierro, manganeso, níquel, cobalto, cobre, cadmio, plomo, o mezclas de 2 o más cualesquiera de los mismo. En una realización preferida de la presente invención se utiliza calcio como entrecruzador del polímero entrecruzable iónicamente de la mezcla de encapsulación.

10 Para la presente invención, este alginato se puede preparar en agua, o en medio específico para el crecimiento de las células que se van a encapsular.

Para la producción de cápsulas mediante la tecnología FF es necesario la preparación de la mezcla de encapsulación, tal y como hemos descrito anteriormente en la presente invención. La mezcla de encapsulación consta de un polímero entrecruzable iónicamente, el preferido
15 para esta invención es el alginato, y de las células específicas que queremos encapsular.

La proporción de células utilizadas para la mezcla de encapsulación determinará la cantidad de células presentes en una microesferas. En la realización preferida de la presente invención, el objetivo principal es obtener entre 1 y 2 células por cápsula.

El tamaño preferido de microesferas en el contexto de esta invención es de 80 a 200 μm .
20 Siendo preferible pero no indispensable, una encapsulación monodispersa con un coeficiente de variación por debajo de 20%.

En el contexto de la presente invención, una vez concluida la encapsulación, las microesferas se pueden recoger mediante diversas metodologías, las microesferas pueden ser centrifugadas y lavadas abundantemente con agua antes de transferirlas al medio de cultivo específico para
25 el tipo celular encapsulado o en un segundo aspecto de esta invención, las células pueden ser filtradas mediante un filtro de nylon de 70 μm . La realización preferida de esta invención es el filtrado de las microesferas, puesto que además mediante este filtrado se elimina cualquier satélite o irregularidad que haya podido suceder mediante el procedimiento de encapsulación.

Una vez concluido el procedimiento de encapsulación, el siguiente paso en el desarrollo de esta invención es la incubación de las microesferas con el compuesto específico objeto del análisis.

5 Las distintas condiciones de incubación se realizarán con microesferas procedentes de una única encapsulación, la realización de los cálculos de microesferas requeridas para tener todos los puntos requeridos para la realización de un análisis completo es fundamental para un desarrollo óptimo de la presente invención.

10 En una realización preferida de la presente invención el compuesto a analizar es un antibiótico. Las células encapsuladas corresponden con un microorganismo patógeno. Se realizará un barrido de concentraciones de antibióticos en un medio de cultivo óptimo para el crecimiento del microorganismo seleccionado. Se incluirá una concentración 0 de antibiótico que corresponderá con un control positivo de la formación de microcolonias.

15 En la realización preferida de esta invención, pero no excluyente de cualquier otro modo de dispensación e incubación, el medio se repartirá en tubos cónicos con una capacidad 10 veces mayor que el volumen de medio que se le va a añadir (tubos de 50mL para 5mL de cultivo).

Las microesferas se repartirán de forma homogénea entre todas las condiciones de antibióticos a analizar. En una realización preferida de esta invención, las microesferas se resuspenderán en un volumen determinado de medio de cultivo específico para el microorganismo encapsulado. Se repartirá volúmenes iguales de cápsulas a cada condición.

20 El tiempo de incubación se determinará empíricamente para cada microorganismos. El tiempo mínimo de incubación será aquel necesario para identificar microcolonias de aproximadamente un tercio del volumen total de la microesferas en la condición control del análisis, en condiciones de crecimiento óptimas sin ningún compuesto en el medio.

25 En una realización preferida de la invención, el tiempo de incubación puede ser reducido de 16-24h a 6h en microorganismos de rápido crecimiento y de 12-15 días a 2-4 días en microorganismos de crecimiento lento como el *Mycobacterium tuberculosis*.

En el caso de la encapsulación de muestras clínicas de forma directa, las incubaciones se regirán por las mismas normas que las descritas anteriormente, a excepción de que en ese caso, las incubaciones son más largas, requiriéndose al menos 16h para observar un patrón

claro de crecimiento y sensibilidad. En cualquier caso, al suprimir el paso de aislamiento de colonias y preinóculos, el tiempo global se ve reducido de 48-72 h a 20h con todos los pasos del procedimiento incluidos.

5 En la presente invención el método de análisis seleccionado puede ser mediante un análisis de imágenes de las microesferas tomadas desde un microscopio.

En una realización preferida de la invención, las microesferas que han sido incubadas durante un tiempo determinado, se transfieren, preferiblemente pero no excluyente, a un portaobjetos, donde van a ser examinadas por microscopia para determinar el tamaño de las microcolonias en la condición control del análisis.

10 El microscopio preferido para esta invención es un microscopio óptico con un objetivo 4x, aunque también puedes ser utilizado uno 2,5x o un 10x. En la realización preferida de esta invención, el microscopio es invertido.

15 Para el análisis de las microcolonias, lo más conveniente para tener un tratamiento estadístico es hacer fotos secuenciales de las microesferas después de la incubación. Para una realización sobradamente representativa, es preferible realizar un número de imágenes para tener un mínimo de 100 microcolonias.

El análisis de las microcolonias se realizará preferentemente obteniendo una serie de parámetros relevante:

20 1.- Número de microesferas: Se realizará una identificación y conteo de microesferas presentes en la preparación.

2.- Conteo de microcolonias: Durante la identificación y conteo de las microcolonias presentes en las cápsulas se pueden dar varios casos dependiendo del efecto que el compuesto analizado tiene sobre el microorganismo encapsulado:

25 a- Si el compuesto tiene un efecto lento sobre las colonias, o una penetración lenta a través de las cápsula por sus características químicas o es un citoestático o cualquier otra causa que permita a las células realizar algunas divisiones antes de que el compuesto haga su efecto total sobre la misma, el conteo de las capsulas será semejante entre todas las condiciones del análisis.

b- Si el compuesto no tiene el efecto descrito en el punto uno de la siguiente lista, el conteo de las colonias será inferior, puesto que el número de clones que dará lugar a una microcoloniaes típicamente 0. En casos extremos el número de microcolonias será 0. En casos de heteroresistencia o efecto heterogéneo del compuesto sobre la población o en el caso de mutantes, se producirá la identificación de alguna microcolonia aislada dentro de la población.

3.- Tamaño de las microcolonias: Al igual que en el conteo podemos encontrar dos posibilidades en el contaje de colonias:

a- Si el compuesto tiene un efecto lento sobre las colonias, o una penetración lenta a través de las cápsula por sus características químicas o es un citoestático o cualquier otra causa que permita a las células realizar algunas divisiones antes de que el compuesto haga su efecto total sobre la misma, el conteo de las capsulas será semejante entre todas las condiciones del análisis. Sin embargo el tamaño de las microcolonias será significativamente menor. Al menos se identificará una reducción en el tamaño de 2,5 veces el tamaño de las microcolonias en la condición control.

b- Si el compuesto no tiene el efecto descrito en el punto uno de la siguiente lista, el conteo de las colonias será inferior, puesto que el número de clones que dará lugar a una microcoloniaes típicamente 0. En casos de heteroresistencia o efecto heterogéneo del compuesto sobre la población o en el caso de mutantes, se producirá la identificación de alguna microcolonia aislada dentro de la población. En este caso, el tamaño general de las microcolonias será indetectable, sin embargo, los clones mencionados con anterioridad, que presenten mutaciones, o heteroresistencia pueden llegar a presentar un tamaño similar al observado en la condición control.

La representación de los datos en la metodología de esta invención, preferida pero no excluyente de cualquier otra, sería la distribución normal de los tamaños obtenidos en cada una de las condiciones incluyendo al control. Otra forma de representar los datos sería la representación de los diámetros medios de las microcolonias presentes en cada condición.

Análisis de la desviación estándar, de los tamaños máximos y mínimos, así como los coeficientes de variación de las microcolonias en cada condición proporcionan información

fundamental para la obtención de resultados objetivos e identificación de resistencia heterogénea.

5 En otro aspecto de la presente invención, las microesferas que contienen microcolonias en ambientes donde la mayoría de las microesferas están sin crecimiento celular pueden ser identificadas como clones mutantes o clones con heteroresistencia dentro de una población. Dichos clones pueden tener un interés específico para su identificación y caracterización.

10 La selección de dichas microesferas y aislamiento de dichas capsulas se puede llevar a cabo mediante el uso de una microaguja o micropipeta o pipeta Pasteur. Mediante estas herramientas típicas de laboratorios, se pueden aislar las microesferas con la microcolonia de interés, visualizando la operación al microscopio, y transferir dicha capsula a un medio de cultivo óptimo para la expansión de esa célula seleccionada.

15 Debido a las características de las microesferas utilizadas en la presente invención, no es necesario disgregar la microesferapara permitir la expansión de la colonia, el crecimiento dentro de la cápsula no está limitado por el hidrogel, así que seguirá creciendo hasta que la microcolonia de su interior alcance el borde de la microesferas, una vez que la microcolonia se haya expandido hasta el borde, las células pueden salir al exterior y crecer como un cultivo estándar en suspensión.

Ejemplos

Ejemplo 1: Determinación de patrones de resistencia a antibióticos en patógenos oportunistas.

Se parte de un cultivo axénico de *Acinetobacterbaumanii* obtenido a partir de una muestra
5 clínica. Se parte de un cultivo creciendo en fase logarítmica y se mide la densidad óptica
OD600.

Previamente se han preparado las soluciones necesarias para la encapsulación. Se ha
preparado el alginato al 1,5%, en agua. El alginato se esteriliza por filtración a través de un
tamaño de poro de 20um. Se ha preparado también el cloruro cálcico al 3% en agua, que
10 también se esteriliza por filtración.

Se realiza un inóculo de $1,5 \times 10^6$ células /mL de alginato, la mezcla se agita suavemente por
inversión para garantizar una distribución homogénea de las células en el alginato. Se procede
a la encapsulación, para la encapsulación se utiliza un nebulizador de 200um que produce
partículas entre 100 y 120 um de diámetro. Para la encapsulación por FF mediante este
15 nebulizador y estas condiciones de alginato y células se necesita un flujo de aire a una presión
de 60mBar. Y la encapsulación se lleva a cabo a una velocidad de 3mL/h. Las partículas caen
en un baño de cloruro cálcico al 3% en agitación, la agitación ha de ser suficientemente fuerte
para mantener las cápsulas en movimiento y separadas unas de otras. El chorro de
microesferas no puede caer directamente sobre el remolino producido por el agitador.

20 Una vez completa la encapsulación, se recogen las capsulas mediante un filtro de 70 um. Se
lavan con abundante PBS y se resuspenden en 2mL de LB y se reparten 200uL de esta
suspensión de cápsulas por cada condición de antibiótico a testar, en este ejemplo se van a
utilizar dos antibióticos a 4 concentraciones cada uno más el control, por lo que se repartirían
200ul en cada uno de las nueve condiciones a testar en 3mL de medio de crecimiento LB + la
25 concentración del antibiótico a testar.

Se procede a la incubación de las cápsulas a 37°C, 200rpm durante 6h. A las 6h se toman
10uL de cada condición y se analizan las microcolonias por microscopia.

Se procede al conteo de las microcolonias y a la representación de la distribución de los
diámetros de las mismas según las condiciones de antibióticos testadas frente al control sin

antibióticos y se determina que condición es la mínima inhibitoria para esta cepa en concreto de *Acinetobacter*.

El total de tiempo desde el inóculo del alginato, hasta la obtención de resultados es de 7-8h.

Ejemplo 2: Identificación de heterorresistencias

5 El procedimiento de encapsulación y de análisis es el mismo que el descrito en el ejemplo 1.

Sin embargo, bajo determinadas condiciones y ante antibióticos específicos se ha descrito la presencia de heterorresistencias en poblaciones microbianas axénicas, la metodología descrita en la presente invención permite la identificación de esos clones resistentes dentro de una población mayoritariamente sensible. La caracterización de estos clones y la posibilidad de su estudio es una herramienta fundamental para la microbiología clínica.

La identificación de clones resistentes en poblaciones mayoritariamente sensible, puede tener una significancia importante a la hora de explicar factores como el desarrollo de multirresistencias y las reservas patogénicas.

Reivindicaciones

1- Un procedimiento para la determinación de patrones de susceptibilidad a antibióticos de microorganismos caracterizado por:

- 5 a. Una muestra que contiene el de microorganismo que se mezcla con una solución con una sustancia gelificante
- b. Un sistema de enfocamiento de flujo que produce gotas monodispersas de entre 30 y 300 μm de tamaño a partir de esa mezcla de células con hidrogeles y que acaban gelificando formando microesferas conteniendo al microorganismo objeto del estudio
- 10 c. Incubación de al menos dos series de dichas microesferas en un medio de cultivo, un tiempo y una temperatura que permita al menos 3 generaciones de los microorganismos a estudiar en ausencia de los distintos compuestos antimicrobianos cuyas actividades se quieren evaluar y en el que al menos una serie es incubada en presencia de los compuestos antimicrobianos a probar.
- 15 d. Análisis del tamaño y del número de las microcolonias formadas mediante un analizador de imágenes en muestras de microesferas incubadas en presencia y en ausencia de dichos compuestos antimicrobianos.
- 2- Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque la muestra es una muestra clínica tomada directamente del paciente humano.
- 20 3-. Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2 donde la muestra clínica sufre un procedimiento de 30 minutos previo a su inoculación en la sustancia gelificante.
- 4-. Procedimiento según las reivindicaciones 1-3 según el cual se diluye la muestra clínica al menos 50 veces en una solución.
- 5-. Procedimiento según las reivindicaciones 1-4 según el cual se somete a vortex o agitación la muestra diluida durante al menos 1 minuto.
- 25 6-. Procedimiento según las reivindicaciones 1-5 según el cual se inocula esta dilución en 1 mL de sustancia gelificante.

- 7-. Procedimiento según la reivindicación 1 donde la muestra procede de un cultivo axenico o puro.
- 8-. Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque la sustancia capaz de producir hidrogeles contiene alginato,
- 5 9- Procedimiento según la reivindicación 1 y 9 caracterizado porque gelifica cuando las gotas que entran en una solución con iones de calcio..
- 10- Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque la solución con los microorganismos y la sustancia gelificante generan microgotas monodispersas a través de un dispositivo de enfocamiento de chorros,
- 10 11- Procedimiento según la reivindicación 1 caracterizado porque las microesferas tienen un tamaño entre 80-200 μm
- 12- Procedimiento según las reivindicaciones 1,8 a 11 caracterizado por que las microesferas se incuban en medio de cultivo que permita el crecimiento de los microorganismos objetos del estudio.
- 15 13- Procedimiento según las reivindicaciones 1, 8 a 12 caracterizado por que se aíslan distintas muestras de microesferas en distintos recipientes a los que se añaden compuestos inhibidores del crecimiento microbiano del tipo de los antibióticos, antifúngicos, sulfamidas, y otros compuestos cuya actividad inhibidora se quiera determinar frente a los microorganismos en las microesferas..
- 20 14- Procedimiento según las reivindicaciones 1, 8 a 13 por las que los compuestos inhibidores se encuentra a distintas concentraciones.
- 15- Procedimiento según la reivindicación 1 y cualquiera de las reivindicaciones de la 8 a 14 caracterizado porque las microesferas y las células microencapsuladas son analizadas por un microscopio y un programa de análisis de imagen que identificarían crecimiento celular
- 25 midiendo los diámetros de microcolonias.

Figura 1

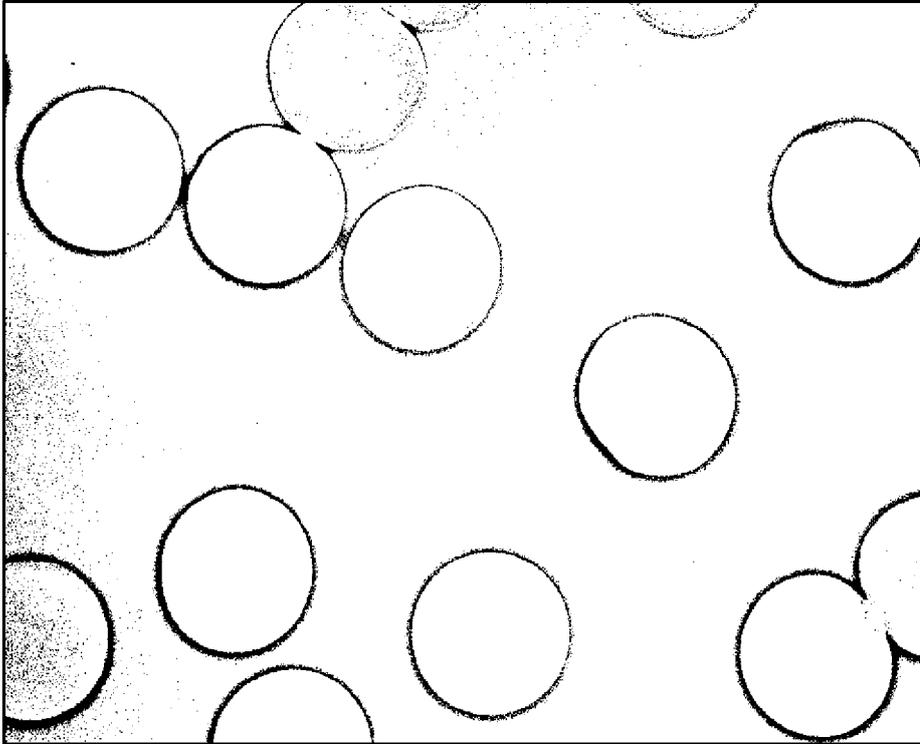


Figura 2

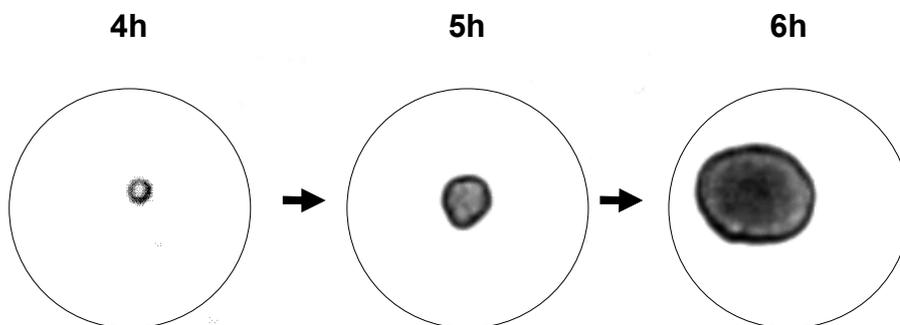


Figura 3

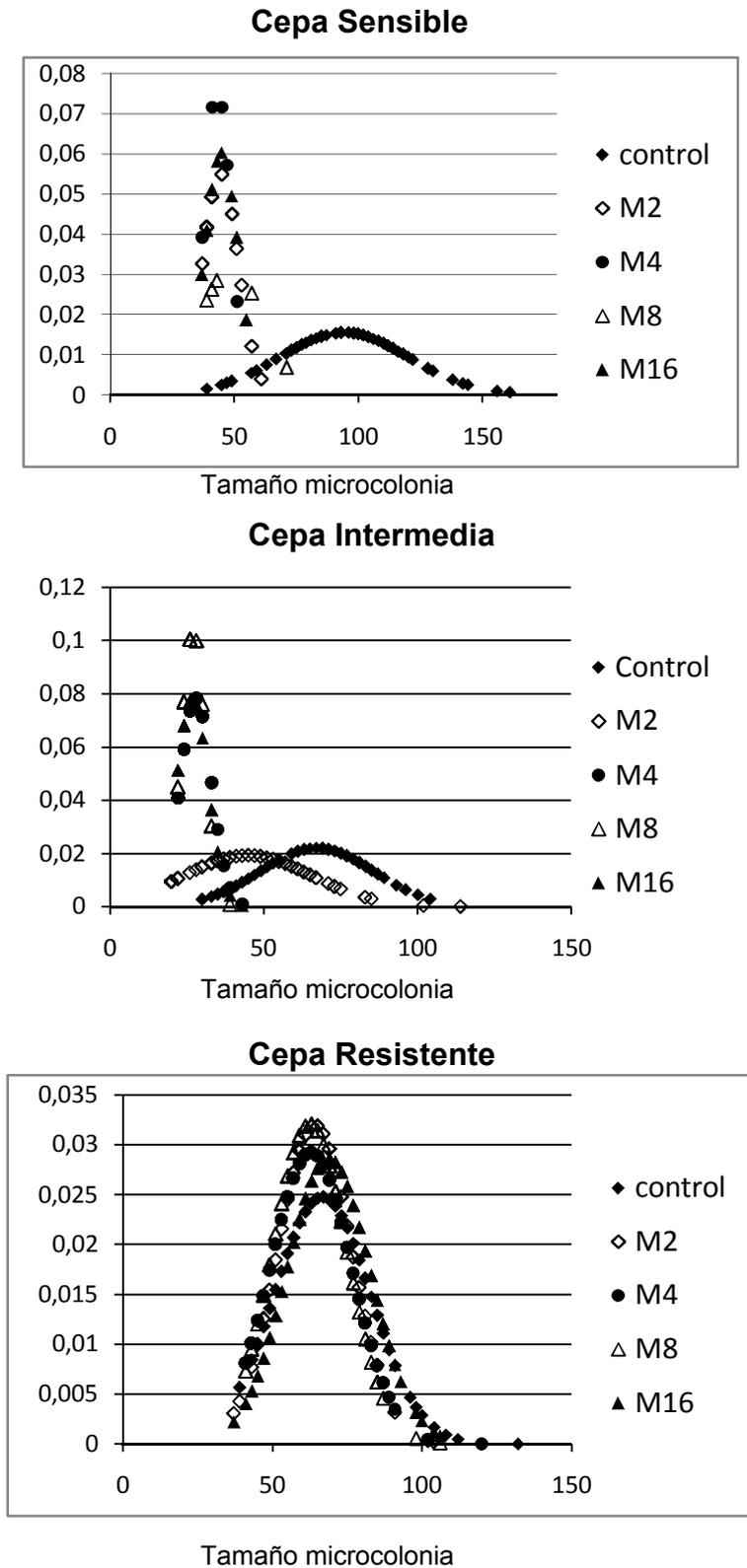


Figura 4

